

Aus dem Hygiene-Institut der Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siebert

Die Chlamydosporenbildung bei *Candida albicans* als Kriterium für eine Schnelldiagnostik

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karin Koeppe

aus Berlin

Marburg 1967

Aus dem Hygiene-Institut der Universität in Marburg

Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Die Chlamydosporenbildung bei *Candida albicans* als Kriterium für eine Schnelldiagnostik



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Karin Koeppe

aus Berlin

Marburg 1967

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg/Lahn am: 8.8.1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Professor Dr.med., Dr.med.dent.habil. H. Heuser

Referent: Professor Dr. med. R. Siegert

Correferent: Professor Dr. med. dent. G. Janke

.....

.....

.....

.....

Meiner lieben Mutter
in Dankbarkeit

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Methodik</u>	2
I. Hefestämme	2
II. Nährböden	2
III. Objektträger-Überschichtungsmethode nach SCHIFF	4
C. <u>Ergebnisse</u>	5
I. Einfluß der Temperatur auf die Chlamydo- sporenbildung	5
II. Einfluß verschiedener Nährböden auf die Entwicklungsdauer der Chlamydosporen	5
III. Wachstum der Hefen und des Pseudomycels bei verschiedenen Temperatur- und Nähr- bodenbedingungen	8
IV. Entwicklung der Chlamydosporen	9
V. Prüfung anderer Hefen auf Chlamydosporen- bildung	14
VI. Modifizierung von Nährböden zur Aktivie- rung der Chlamydosporenbildung	15
VII. Prüfung des Verfahrens nach SCHIFF in der Routinediagnostik	17
D. <u>Diskussion</u>	23
E. <u>Zusammenfassung</u>	26
F. <u>Literatur</u>	27

A. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten haben die Sprosspilze als Krankheitserreger an Bedeutung gewonnen. Am häufigsten werden Mykosen durch Vertreter der Candida-Gruppe verursacht. Unter den fakultativ pathogenen Hefen ist *Candida albicans* am weitesten verbreitet. Da die biochemische Differenzierung einen großen Zeit- und Materialaufwand erfordert, haben zahlreiche Autoren (1 - 13) ein einfaches Verfahren zur Schnelldiagnostik zu entwickeln versucht. Als wichtigstes Kriterium wird meist die Chlamydosporenbildung herangezogen (6 - 13), wozu außer *C. albicans* auch noch *C. stellatoidea* und *C. rekaufii* befähigt sind. Da die beiden letzteren Hefen jedoch nur sehr selten als Krankheitserreger angetroffen werden, spricht die Chlamydosporenbildung mit hoher Wahrscheinlichkeit für *C. albicans*. Sie ist deshalb für eine vorläufige Schnelldiagnose durchaus verwendbar.

Vor ca. 6 Jahren hat SCHIFF (unveröffentlicht) an unserem Institut die halbanaerobe Objektträger-Überschichtungsmethode mit Kartoffel-Karotten-Agar (11) eingeführt, die eine Identifizierung von *C. albicans* auf Grund der Chlamydosporenbildung innerhalb von 24 bzw. 48 Std. ermöglicht.

In der vorliegenden Studie wird diese Methode im Hinblick auf ihre Schnelligkeit und Zuverlässigkeit mit anderen, in der Literatur angegebenen Verfahren verglichen.

B. Methodik

=====

I. Hefestämme

50 Stämme	<i>Candida albicans</i>	aus Untersuchungsmaterial
5 "	" <i>tropicalis</i>	" "
1 Stamm	" <i>pulcherrima</i>	" "
1 "	" <i>pseudotropicalis</i>	" "
1 "	" <i>albicans</i>	CBS 256
1 "	" <i>tropicalis</i>	CBS 94
1 "	" <i>curvata</i>	CBS 570
1 "	" <i>Krusei</i>	CBS 573
1 "	" <i>utilis</i>	CBS 040
1 "	" <i>stellatoidea</i>	CBS 1905
1 "	" <i>robusta</i>	CBS 2270
1 "	<i>Torulopsis glabrata*</i>	
1 "	" <i>famata*</i>	

II. Nährböden

1. Kartoffel-Karotten-Agar nach PAVLATOU und MARCELOU (11):

Je 20 g aus dem Inneren von Kartoffeln und Karotten wurden mit 150 ml Rindergalle und 20 g Agar in 1000 ml Aqua dest. bei kleiner Flamme bis zur Lösung des Agars gekocht. Nach Papierfiltration wurde die Flüssigkeit auf 1000 ml ergänzt, zu je 5 ml in Reagenzgläser abgefüllt und anschließend 30 Min. autoklaviert.

2. Tween-Dextrose-Medium nach SEELIGER (8):

4 g Agar wurden in 1000 ml Aqua dest. durch Kochen gelöst und durch Filtrierpapier klar filtriert. Zur Lösung kamen noch 5 g Kochsalz, 1 g Dextrose sowie - unter kräftigem Schütteln - 10 ml Tween-80 hinzu. Das wasserklare Medium

* Wir danken Herrn Professor Dr. SEELIGER, Würzburg, für die Überlassung der beiden Stämme.

wurde zu je 5 ml in Reagenzgläser abgefüllt, die nach 15 Min. Autoklavieren vor dem Erstarren nochmals kräftig geschüttelt wurden, damit sich das während des Erhitzens in der Röhrchenkuppe angesammelte Tween-80 gründlich mit dem übrigen Substrat mischte. Der pH-Wert des fertigen Nährbodens betrug 7,2. Gegen Austrocknung geschützt, war das Medium mehrere Monate haltbar.

3. Serum-Tellurit-Agar nach KAFFKA (5):

400 ml eines verflüssigten 3,2%igen Fleischwasseragars (hergestellt aus 400 ml Fleischwasser, 4 g Pepton, 1,2 g Kochsalz, 0,8 g sek. Natriumphosphat und 12,8 g Agar) wurden mit 320 ml Aqua dest. und 32 ml Kaliumtelluritlösung (1%ig) versetzt, gut durchgeschüttelt und auf 50°C abgekühlt. Nach Zugabe von 80 ml sterilen Rinderserums erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4. Der Nährboden wurde dann in Petrischalen gegossen.

4. Salzsaures und milchsaures Kartoffelsubstrat nach MEHNERT (2):

Je 100 g geschälter, kleingeschnittener Kartoffeln verblieben für 1 Std. in Erlenmeyerkolben mit 100 ml physiologischer Kochsalzlösung und 1 ml Salzsäure (36,4%ig) bzw. 4 ml Milchsäure (83 - 90%ig). Die überstehende Flüssigkeit wurde nach Seitzfiltration zu je 5 ml in Reagenzgläser abgefüllt.

5. Klare Malzbrühe nach VITĚZ (22):

30 g gemahlenes Malz wurden in 200 ml Aqua dest. und 8 ml Salzsäure (25%ig) gelöst, 20 Min. autoklaviert und durch ein nasses Tuch filtriert. Das Filtrat, auf 200 ml ergänzt und neutralisiert, mußte aufgekocht und erneut filtriert werden. Es wurde in Reagenzgläser abgefüllt und 20 Min. autoklaviert.

III. Objektträger-Überschichtungsmethode nach SCHIFF

Nach Überimpfen geringer Mengen einer Reinkultur von Hefen auf mehrere Stellen eines abgeflamten Objektträgers wurde verflüssigter Kartoffel-Karotten-Agar darüber pipettiert. Nach Erstarren des Agars verblieben die so präparierten Objektträger zur Bebrütung in einer feuchten Kammer für 6 Std. bei 37°C, anschließend für 12 - 18 Std. bei 20°C. Nach einer Bebrütungsdauer von insgesamt 18 - 24 Std. ließen sich die Chlamydosporen gut durch die dünne Agarschicht mikroskopieren.

Zum Vergleich wurde nach dieser Methode auch der von SEELIGER angegebene Nährboden geprüft. Der Serum-Tellurit-Agar nach KAFFKA erwies sich jedoch als ungeeignet für die Überschichtungsmethode wegen seines Gehaltes an Serum, das beim Erhitzen gerinnt und dadurch die Agarschicht undurchsichtig macht. Er wurde nur nach Originalangabe verwendet.

C. E r g e b n i s s e

I. Einfluß der Temperatur auf die Chlamydosporenbildung

Die Chlamydosporenbildung wird allgemein bei unterschiedlichen Temperaturen geprüft. Deshalb galt es zunächst, die Frage zu beantworten, ob die Bebrütungstemperatur einen Einfluß auf die Chlamydosporenbildung ausübt, und inwieweit das Temperaturoptimum vom Nährboden abhängt. Die Untersuchung erfolgte auf Kartoffel-Karotten-Agar, Serum-Tellurit-Agar und Tween-Dextrose-Medium mit Bebrütungstemperaturen von 20°C, 30°C, 37°C und 37°C mit Wechsel nach 6 Std. auf 20°C. In 15 Versuchen erwies sich die Bebrütung bei 30°C übereinstimmend als ungeeignet für die Chlamydosporenbildung, so daß auf sie verzichtet wurde. Aus Abb. 1 geht hervor, daß die Chlamydosporenbildung erwartungsgemäß temperaturabhängig ist und von der Beschaffenheit des Nährbodens beeinflusst wird. So wurde auf KAFFKA-Agar der größte Prozentsatz chlamydosporenbildender Stämme bei 37°C gefunden, auf SEELIGER-Agar nach Wechsel von 37°C auf 20°C, während beim Kartoffel-Karotten-Agar die Kombination 37°C/20°C und die Bebrütung bei 20°C fast gleichwertige Ergebnisse lieferten.

II. Einfluß verschiedener Nährböden auf die Entwicklungsdauer der Chlamydosporen

Für die Schnell Diagnostik ist neben der Ausbeute an chlamydosporenbildenden Stämmen auch die Entwicklungsdauer der Chlamydosporen maßgebend. Wie sich aus Abb. 2 ergibt, beschleunigte bei Kartoffel-Karotten-Agar der Temperaturwechsel 37°C/20°C die Chlamydosporenbildung eindeutig. Bei 20°C hatten erst am dritten Tag fast ebensoviele Stämme Chlamydosporen ausgebildet. Ferner war der Kartoffel-Karotten-Agar den beiden anderen Nährböden sowohl in der Schnelligkeit der Chlamydosporenbildung als auch im Erfassen der chlamydosporenbildenden Stämme deutlich überlegen.

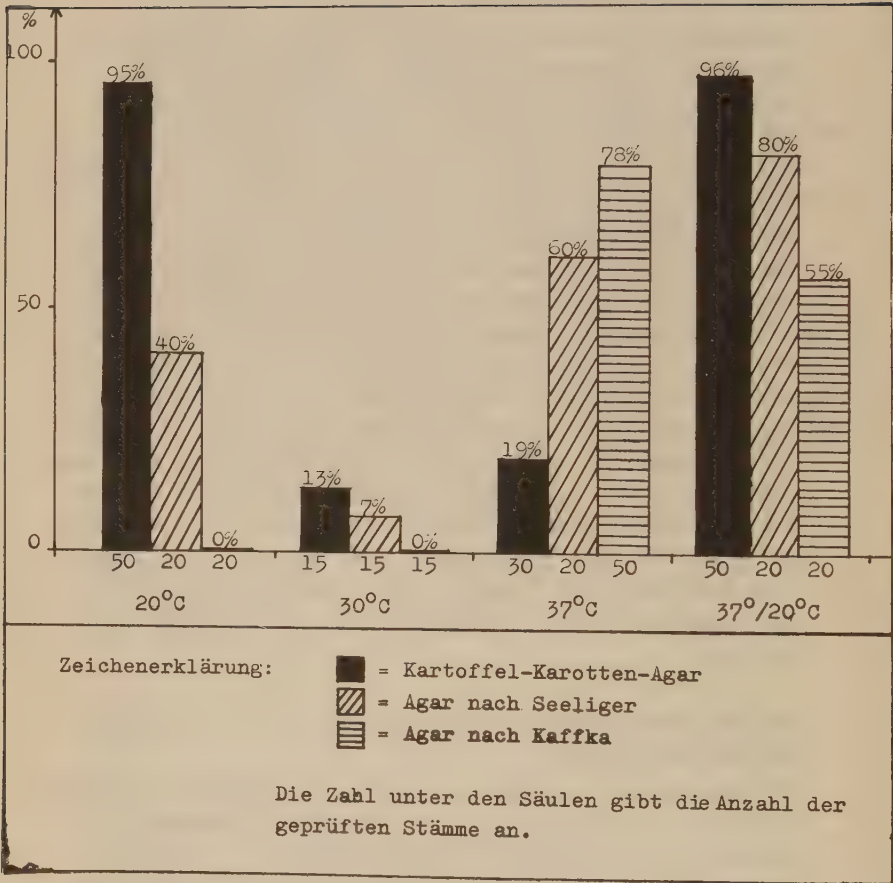


Abb. 1 Chlamydosperenbildung auf verschiedenen Nährböden bei unterschiedlichen Temperaturen.

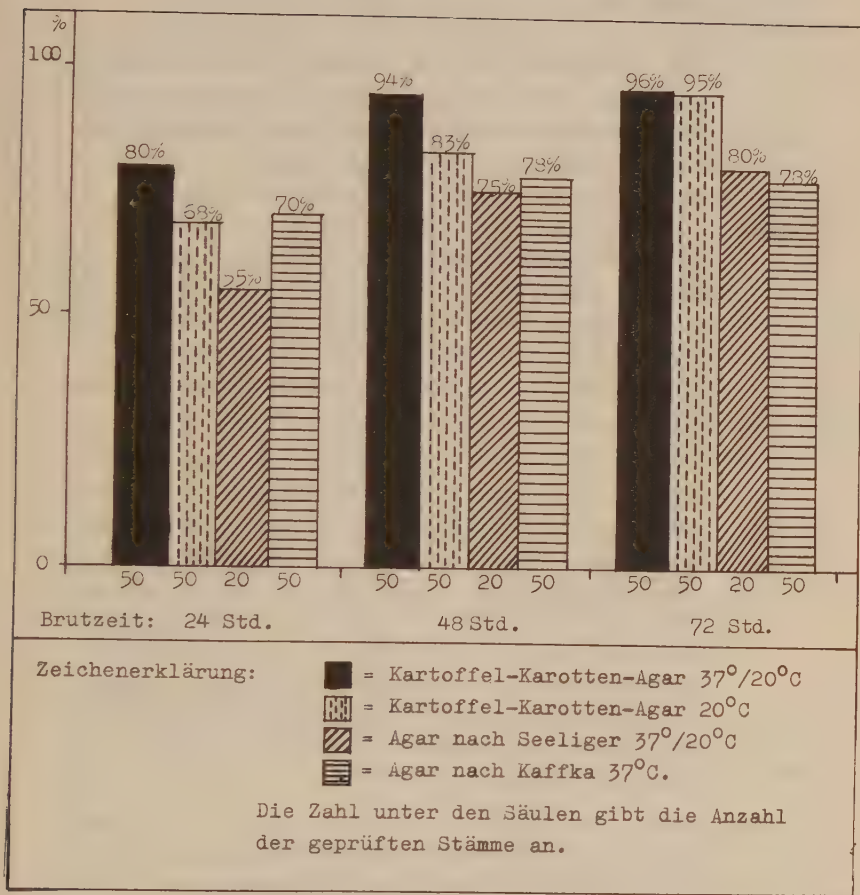


Abb. 2 Dauer bis zur Chlamydosporienbildung bei den ermittelten Temperaturoptima der verschiedenen Nährböden.

III. Wachstum der Hefen und des Pseudomycels bei verschiedenen Temperatur- und Nährbodenbedingungen

- 20°C: Unter Kartoffel-Karotten-Agar bildeten die *C. albicans*-Zellen ein Pseudomycel, das die Hefekolonien sehr gleichmäßig und dicht umgab. Es lag meist in Mycotoruloidesform vor, seltener in Mycocandida- oder Mycotorulaform. Beim Agar nach SEELIGER vergrößerte sich die Hefekolonie beträchtlich, entwickelte aber nur stellenweise Pseudomycel, in Mycotoruloides- oder Mycotorulaform. Auf Serum-Tellurit-Agar vermehrten sich die Hefen zwar stark, aber es wuchs kein Pseudomycel. Die Chlamydosporen entwickelten sich bei den Stämmen am besten unter Kartoffel-Karotten-Agar (95 % der untersuchten Stämme), weniger gut unter dem Agar nach SEELIGER (40 %), niemals aber auf Serum-Tellurit-Agar.
- 30°C: Hier waren die Hefekolonien unter Kartoffel-Karotten-Agar gleichmäßig von einem anfangs unverzweigten Pseudomycel umgeben, das teilweise sehr lang wurde und in Mycotoruloidesform überging. Unter dem Agar nach SEELIGER vermehrten sich die Hefen sehr gut. Ein Pseudomycel war zwar bei einigen Stämmen zu sehen, jedoch recht spärlich ausgebildet. Auf Serum-Tellurit-Agar erfolgte nur eine Zellvermehrung. Chlamydosporen bildeten von 15 untersuchten Stämmen zwei unter Kartoffel-Karotten-Agar, einer unter SEELIGER-Agar.
- 37°C: Sowohl bei Verwendung von Kartoffel-Karotten-Agar als auch von Agar nach SEELIGER entwickelte sich ein sehr langes Pseudomycel gleichmäßig um die Hefekolonien in Mycotoruloides-, seltener in Mycotorulaform. Auffällig war die gewundene, spiralige Pseudomycelbildung. Auf Serum-Tellurit-Agar sah man das Pseudomycel am häufigsten in Mycotoruloidesform, die sich sehr bald in die Mycotorulaform umwandelte; selten erschien die Blastodendrien- und Mycocandidaform. Chlamydosporen traten am reichlichsten auf

Serum-Tellurit-Agar auf (75 % von 50 untersuchten Stämmen), aber in ihrer Form abweichend von denen der anderen Nährböden; die Chlamydosporenbildung war unter SEELIGER-Agar recht gut (60 %), dagegen unter Kartoffel-Karotten-Agar nur mäßig (20 %).

37°C/20°C: Der Temperaturwechsel bewirkte beim Kartoffel-Karotten-Agar ein ebenso gleichmäßiges, reichliches Pseudomycel wie bei 37°C, jedoch war es nicht so korkzieherartig gewunden. Unter SEELIGER-Agar blieb das Pseudomycel meist kurz und unverzweigt, selten kam die Mycotoruloides- oder Mycotorulaform vor. Die Vermehrung der Hefezellen war auf Serum-Tellurit-Agar sehr gut, die Pseudomycelbildung nur gering, vereinzelt in Mycotoruloides- oder Mycotorulaform. Chlamydosporen bildeten unter Kartoffel-Karotten-Agar 96 %, unter SEELIGER-Agar 80 % und auf Serum-Tellurit-Agar 55 % der geprüften 50 Stämme.

Die von LODDER und KREGER-VAN RIJ beschriebenen 5 Wuchsformen der Candidaarten (Mycotorula-, Mycotoruloides-, Mycocardida-, Candida- und Blastodendriionform) sind in Abb. 3 dargestellt.

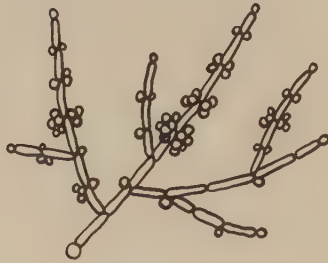
IV. Entwicklung der Chlamydosporen

Unter Kartoffel-Karotten-Agar und Tween-Dextrose-Medium waren folgende Gesetzmäßigkeiten der Chlamydosporenbildung zu erkennen:

1. Die Entwicklung bis zur Chlamydospore verläuft nacheinander in drei Stadien, nämlich Vermehrung, Pseudomycel- und Chlamydosporenbildung.
2. Eine isolierte Hefezelle kann sich nicht unmittelbar in eine Chlamydospore umwandeln und auch nicht direkt eine solche produzieren. Zunächst muß mindestens eine Pseudomycelzelle gebildet werden, die dann als Proechlamydospore fungiert. Die zwischen der ersten Hefezelle und der Chlamydospore liegenden Pseudomycelzellen können weitersporen und ihrerseits Chlamydosporen bilden. Aus Chlamydosporen können aber keine neuen entstehen.



Mycotorula



Mycotoruloides



Mycocandida



Blastodendrion



Candida

Abb. 3

Wuchsformen des Pseudomycels nach LODDER und KREGER-VAN RIJ.

3. Eine Protochlamydospore, oval oder keulenförmig gestaltet, enthält meistens ein oder mehrere sogenannte Tanzkörperchen. Diese kommen auch in größeren Hefezellen vor, wenn diese etwa das 3-4fache des normalen Durchmessers erreicht haben, nicht aber in alten Riesenzellen mit erschlaffter Zellwand. Solange Tanzkörperchen zu sehen sind, ist die Zelle sproßfähig; in Chlamydosporen kommen sie nicht vor.

4. Eine Protochlamydospore kann bis zu drei Chlamydosporen bilden (Abb. 4a). Häufig wachsen zwischen Chlamydospore und Protochlamydospore neue Sproßzellen, die entweder als Traube die Chlamydospore verdecken (4b) oder Pseudomycel entwickeln, das die Chlamydospore zur Seite drängt (4c). Auf diese Weise kann eine intercaläre Chlamydospore vorgetäuscht werden. Bei unseren Untersuchungen traten keine echten intercalären Chlamydosporen, sondern nur terminale auf. Chlamydosporentrauben entstehen, wenn aus einer Protochlamydospore weitere Protochlamydosporen sprossen, die ihrerseits dann Chlamydosporen entwickeln (4d).

Die auf Serum-Tellurit-Agar gebildeten Chlamydosporen unterschieden sich von denjenigen unter den beiden anderen Nährböden. Nach 18 Std. Bebrütung bei 37°C trat terminal an einem dünnen Pseudomycelhalb eine runde, große, doppelt konturierte Zelle auf. Im Gegensatz zu den anderen Chlamydosporen, die von ruhenden Granula angefüllt waren, erschien diese Zelle leer. Innerhalb der nächsten 24 Std. bei Zimmertemperatur sproßten aus dieser Chlamydospore weitere Hefezellen; die Doppelkonturierung wurde undeutlicher, und nur durch ihre Größe unterschied sie sich von anderen. Jetzt konnte man nicht mehr mit Sicherheit *C. albicans* diagnostizieren, da solche großen Zellen auch bei anderen Candidaarten vorkommen.

Abb. 5 und Abb. 6 zeigen Chlamydosporen, wie sie unter Kartoffel-Karotten-Agar und Tween-Dextrose-Medium zu sehen waren, Abb. 7 und Abb. 8 zeigen dieselben auf Serum-Tellurit-Agar.

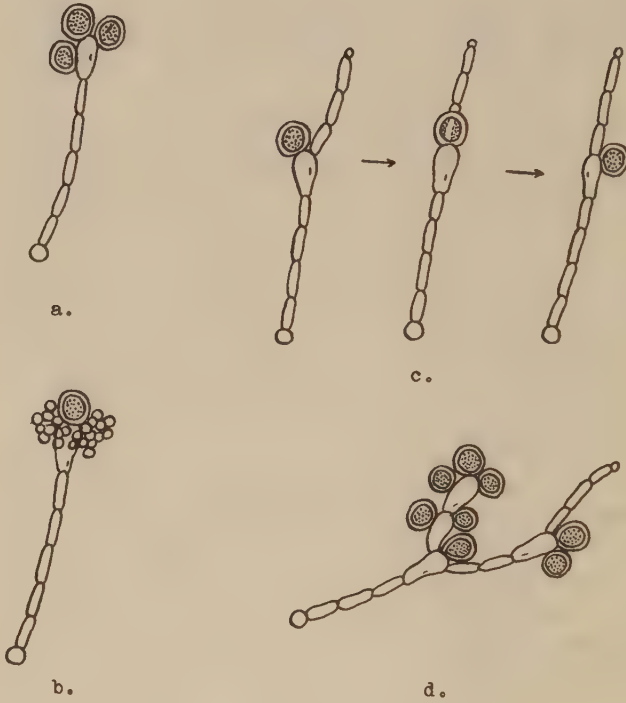


Abb. 4

Verschiedene Formen der Chlamydosporenbildung bei *C. albicans*.

Chlamydosporenbildung von *C. albicans* unter
Kartoffel-Karotten-Agar.



Abb. 5

Bebrütung 6 Std./37°C,
danach 24 Std./20°C; 240x.

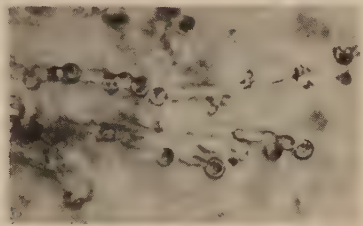


Abb. 6

Bebrütung 6 Std./37°C,
danach 24 Std./20°C; 1200x.

Chlamydosporenbildung von *C. albicans* auf
Serum-Tellurit-Agar.

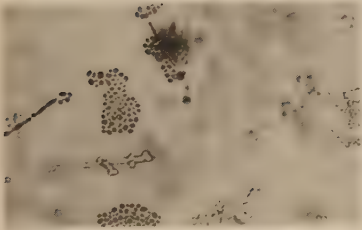


Abb. 7

Bebrütung 18 Std./37°C, 800x.
rechts unten:
sprossende Chlamydospore.

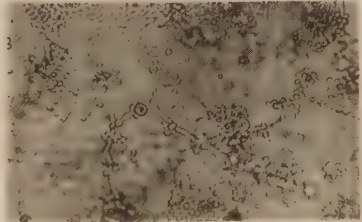


Abb. 8

Bebrütung 18 Std./37°C, 1200x.
rechts Mitte:
ältere Chlamydospore.

V. Prüfung anderer Hefen auf Chlamydosporenbildung

Zur Bestätigung, daß unter den ausgearbeiteten optimalen Bedingungen nur *C. albicans* und *C. stellatoidea* Chlamydosporen bilden können, wurde eine Auswahl anderer Hefen untersucht. Das Ergebnis ist in Tab. 1 dargestellt.

C. stellatoidea verhielt sich, was Vermehrung, Pseudomycel- und Chlamydosporenbildung betrifft, wie C. albicans. Bei C. tropicalis kamen dieselben Wuchsformen vor, jedoch waren die Pseudomycelzellen etwas kürzer und schmaler und enthielten einige Granula. C. Krusei entwickelte ein langes, reichliches Pseudomycel in Candidaform aus länglich-ovalen Zellen, C. pseudotropicalis ein kurzes, unverzweigtes aus kleinen Zellen. Torulopsis glabrata, C. pulcherrima und C. robusta vermehrten sich nur, während C. curvata, C. utilis und Torulopsis famata vereinzelt ein kurzes, unregelmäßiges Pseudomycel bildeten.

Tab. 1 Prüfung anderer Hefen auf Chlamydosporenbildung.

	Kart.-Karat.- Agar	Kart.-Karat.- Agar	Ser.-Tell.- Agar
	37°C/20°C	20°C	37°C
	V P C	V P C	V P C
C.stellatoidea	++ ++ +	++ ++ +	++ ++ +
C.tropicalis	++ ++ -	++ ++ -	++ + -
C.pseudotrop.	+ + -	+ + -	+ - -
C.robusta	+ - -	+ - -	+ - -
C.pulcherrima	+ - -	+ + -	+ - -
C.curvata	+ (+) -	+ - -	+ (+) -
C.Krusei	++ ++ -	++ ++ -	++ + -
C.utilis	+ (+) -	+ (+) -	+ - -
Torulop.glabrata	(+) - -	+ - -	(+) - -
Torulop.famata	+ + -	+ + -	+ (+) -

V=Vermehrung, P=Pseudomycelbildung, C=Chlamydosporenbildung.
 ++ = reichlich, + = mäßig, (+) = gering, - = negativ.

VI. Modifizierung von Nährböden zur Aktivierung der Chlamydo- sporenbildung

1. Zusatz von Thioglykollat zu Nähragar und Sabouraud- Maltose-Agar:

Bei Verwendung von Thioglykollat-Bouillon zur Anreicherung von aeroben und anaeroben Bakterien wurde beobachtet, daß sich darin auch Candida-Hefen vermehren und Pseudomycel bilden. Gelegentlich fand man nach längerer Aufbewahrung der Bouillon sogar Chlamydosporen bei *C. albicans*. Da die Herstellung der Spezialnährböden zur Chlamydosporenbildung für die Nährbodenküche eine zusätzliche Belastung darstellt, sollte geprüft werden, ob der Zusatz von Thioglykollat zu Nähragar oder Sabouraud-Maltose-Agar die Chlamydosporenbildung beschleunigt. Hierzu erhielt die Thioglykollat-bouillon einen Zusatz von entweder 2 % Nähragar oder von 2 % Sabouraud-Maltose-Agar. Beide Nährböden wurden in der Objektträgermethode durch 6 Stämme von *C. albicans* geprüft. Eine Vermehrung der Hefen fand unter jedem Nährboden statt, Pseudomycelbildung bei Sabouraud-Thioglykollat nur in 3 Fällen, hier allerdings reichlich, bei Nähragar-Thioglykollat nur in einem Fall, und zwar vereinzelt.

2. Modifizierung des Kartoffel-Karotten-Agar:

Da die Versuche, Thioglykollat-Bouillon mit einfachen Nährböden zu kombinieren, erfolglos blieben, wurde ausprobiert, ob sich der Kartoffel-Karotten-Agar noch vereinfachen läßt. 10 Stämme von *C. albicans*, die in der Objektträgerkultur mit normalem Kartoffel-Karotten-Agar reichlich und schnell Chlamydosporen gebildet hatten, wurden in 6 Versuchsreihen geprüft (Tab. 2). Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß ohne Nachteil statt 15 % Galle auch 1 % Tween-80 den Nährböden zugesetzt werden kann. Ebenso läßt sich der Kartoffelanteil gegen einen entsprechenden Karottenanteil austauschen, was aber die Methode nur geringfügig vereinfacht. Dagegen bedeutet das Fortlassen der Karotten eine Wertminderung des Mediums.

Tab. 2 Chlamydosporenbildung bei modifiziertem Kartoffel-Karotten-Agar, geprüft an 10 C.-albicans-Stämmen.

Versuchsreihe	1.(Kontrolle)	2.	3.
Zusammensetzung des Agar	Kartoffel 2% Karotten 2% Galle 15%	Kartoffel 4% Galle 15%	Karotten 4% Galle 15%
Anzahl der chlamydosporenbildenden Stämme	10	7	10
Versuchsreihe	4.	5.	6.
Zusammensetzung des Agar	Kartoffel 2% Karotten 2% Tween-80 1%	Kartoffel 4% Tween-80 1%	Karotten 4% Tween-80 1%
Anzahl der chlamydosporenbildenden Stämme	10	7	10

Serum-Tellurit-Agar nach KAFFKA führte in 78 % der untersuchten Stämme zu Chlamydosporenbildung. Zur Beantwortung der Frage, ob durch Kombination der Nährböden eine bessere Ausbeute zu erzielen wäre, wurde Kaliumtelluritlösung in verschiedenen Konzentrationen zu Kartoffel-Karotten-Agar gegeben. Dieser Zusatz machte jedoch den Agar für die Objektträgermethode zu weich, weshalb die Untersuchung auf gegossenen Platten erfolgte, die bei 20°C bebrütet wurden. Es zeigte sich, daß der Zusatz von Kaliumtellurit die Chlamydosporenbildung bei allen 6 Stämmen unterdrückte; merkwürdigerweise war die Hemmung bei den niedrigsten Konzentrationen am stärksten (s. Tab. 3).

3. Abhängigkeit der Chlamydosporenbildung von der Sauerstoffspannung:

Die verwendeten Nährböden unterscheiden sich grundsätzlich in ihrer chemischen Zusammensetzung; allen gemeinsam ist nur das sauerstoffarme Milieu. Dieses wird erreicht bei SEELIGER im Originalverfahren durch die Stichkultur, bei

Tab. 3 Hemmung der Chlamydosporenbildung bei 6 Stämmen von *C. albicans* durch Kaliumtellurit.

Menge der Chlamydosporen	Konzentration des Kaliumtellurits in %						
	Ø	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025
massenhaft	6	1	1	1	-	-	-
reichlich	-	5	1	-	2	1	-
mäßig	-	-	1	1	1	2	1
null	-	-	3	4	3	3	5

KAFFKA durch die reduzierende Wirkung des Tellurits, bei SCHIFF durch die Übersichtung der Hefen mit Nährböden auf dem Objektträger und bei anderen, nicht geprüften Verfahren durch Auflegen eines Deckgläschens. Es ergab sich die Frage, ob sich im sauerstoffarmen Milieu auch auf den zur Anzüchtung von Sprosspilzen dienenden Nährböden, wie z.B. Sabouraud-Maltose-Agar, Chlamydosporen ausbilden. Hierzu wurden 13 Stämme in Petrischalen ausgeimpft und im evakuierten Zeißlertopf bei 20°C bebrütet. Nach 24 Std. hatten 4 von 13 Stämmen Chlamydosporen gebildet (Abb. 9). Daraufhin wurden weitere 24 Stämme von *C. albicans* mit Sabouraud-Maltose-Agar im Übersichtsverfahren geprüft. Von diesen zeigten 13 Stämme nach 24 Std. Chlamydosporen (Abb. 10). Da sich die Chlamydospore auf Serum-Tellurit-Agar nicht voll zu entwickeln schien, wurde untersucht, ob die Sauerstoffspannung infolge der reduzierenden Wirkung des Tellurits vielleicht nicht genügte. Daher wurden 18 Stämme ebenfalls im evakuierten Zeißlertopf bebrütet. Von ihnen zeigten nach 24 Std. 6 deutliche Chlamydosporen wie unter den anderen Nährböden (Abb. 11).

VII. Prüfung des Verfahrens nach SCHIFF in der Routinediagnostik:

Voraussetzung für die Identifizierung von Hefen - ob durch biochemische Methoden oder den Nachweis der Chlamydosporen - bildung - ist deren Anzüchtung und Gewinnung in Reinkulturen.

Chlamydosporenbildung von C. albicans

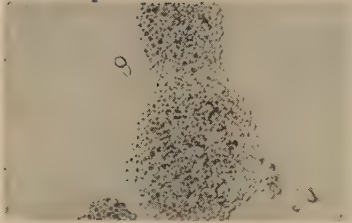


Abb. 9

Sabouraud-Maltose-Agar,
Bebrütung 20°C im evaku-
ierten Zeißlertopf, 1000 x.

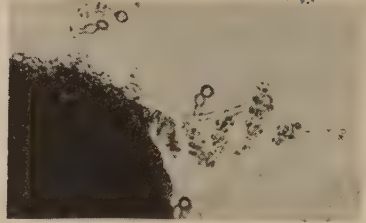


Abb. 10

Sabouraud-Maltose-Agar,
Überschichtungsmethode,
Bebrütung 20°C, 1000 x.

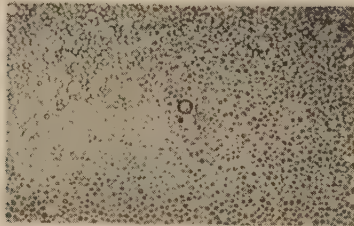


Abb. 11

Serum-Tellurit-Agar,
Bebrütung 20°C im evaku-
ierten Zeißlertopf, 1000x.

Die Nährböden zur Anzüchtung haben in erster Linie die Aufgabe, einen möglichst hohen Prozentsatz der im Untersuchungsmaterial vorkommenden Sproßpilze zu erfassen, während diejenigen zur Reinzüchtung einzelne im Wachstum derart fördern sollen, daß man schnellstens Reinkulturen

erhält. Im Idealfall kann die eine oder andere Hefe gleich auf dem Anzüchtungsnährboden diagnostiziert werden. Für *C. albicans*, die aus Untersuchungsmaterial am häufigsten isolierte Hefe, bieten sich hierfür der schon vorher verwendete Serum-Tellurit-Agar nach KAFFKA sowie die Salzsäure- und Milchsäuremedien nach MEHNERT an. Im salzsauren Medium sollen nur *C. Krusei*, *Torulopsis glabrata* und *C. albicans* wachsen. *C. Krusei* unterscheidet sich von den beiden anderen durch Hautbildung, *Torulopsis glabrata* von *C. albicans* dadurch, daß sie kein Pseudomycel entwickelt. Alle übrigen Candidaarten sollen nur im Milchsäuremedium gedeihen. An 90 Untersuchungsproben wurden die MEHNERT'schen Brühen und der Serum-Tellurit-Agar sowie die Malzbrühe nach VITÉZ auf ihre Verwendbarkeit zur Anzüchtung und Diagnosestellung geprüft. Das Material setzte sich folgendermaßen zusammen: Abstriche (25), Sputum (24), Stuhl (20), Liquor (6), Blut (5), Urin (4) und Gewebe (je 3 Lymphknoten und Nägel). Wie aus Tab. 4 hervorgeht, sind die Anzüchtungsbedingungen in der Malzbrühe optimal, dann folgt der Sabouraud-Maltose-Agar. Mit den MEHNERT'schen Brühen und dem Serum-Tellurit-Agar wurde schon ein beträchtlicher Prozentsatz von Hefen nicht mehr erfaßt.

Tab. 4 Anzüchtung von Hefestämmen aus Untersuchungsmaterial auf verschiedenen Nährböden.

Material	Sabouraud-Maltose-Agar	Vitéz Malzbrühe	Serum-Tellurit-Agar	Mehnert I + II	
				HCl	C ₃ H ₆ O ₃
Abstrich 25	16	18	13	14	16
Sputum 24	18	20	16	15	17
Stuhl 20	16	17	11	7	12
Liquor 6	--	--	--	--	--
Gewebe 6	1	2	1	2	2
Blut 5	--	--	--	--	--
Urin 4	2	2	2	2	1
Wachstum insgesamt	53 = 59 %	59 = 66 %	43 = 48 %	I: 40 = 44 % II: 48 = 53 %	

In der Malzbrühe vermehrten sich die Hefen derart üppig, daß sie, nach Überimpfen auf Sabouraud-Maltose-Agar, selbst reichlich vorhandene Bakterienflora schnell überwucherten. Vereinzelt im Untersuchungsmaterial vorkommende Hefen konnten nach Anreicherung in der Malzbrühe auf Sabouraud-Maltose-Agar erfaßt werden. Auf diese Weise wurden Hefen zusätzlich in 6 Fällen gewonnen.

Der Serum-Tellurit-Agar erwies sich zur Anzüchtung weniger geeignet. Dagegen bot er für die Beurteilung der Relation zwischen Hefen und Bakterien, die bei dem ubiquitären Vorkommen der Sproßpilze von großer Bedeutung ist, Vorteile. Wie Abb. 12 und 13 zeigen, wachsen die Hefen weiß bis hellgrau, die Bakterien dunkelbraun bis tiefschwarz.

Die 59 angezüchteten Sproßpilze wurden mit Hilfe der Fermentierung und Assimilierung von 5 Zuckerarten differenziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 5, Spalte 1, verzeichnet. Spalte 2 zeigt die Gegenüberstellung der auf Serum-Tellurit-Agar und in den MEHNERT'schen Substraten nicht erfaßten Stämme. Hiervon sind die Candidaarten in beiden Fällen ungefähr gleichmäßig betroffen.

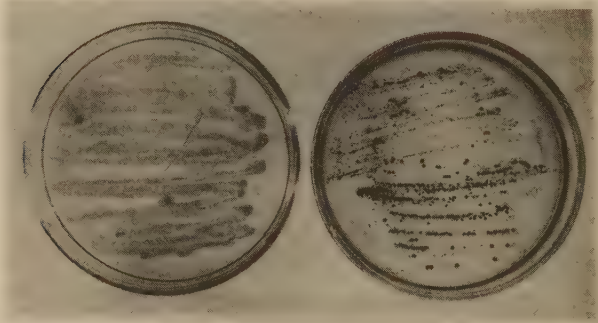


Abb. 12 Hefen-Bakterien-Mischkultur. Links: Sabouraud-Maltose-Agar. Rechts: Serum-Tellurit-Agar.
Verkleinerung 1 : 2.

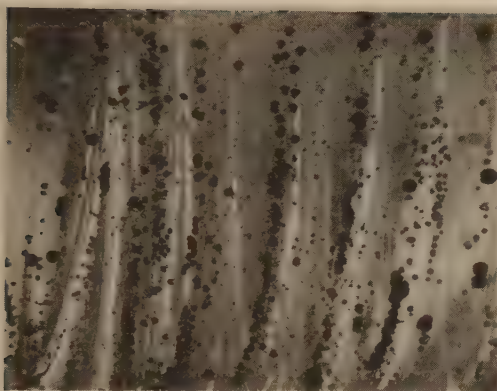


Abb. 13 Ausschnitt aus Abb. 12 ,
Serum-Tellurit-Agar, Vergr. 2:1.

Tab. 5 Verteilung der angezüchteten bzw. nicht erfaßten
Candida-Stämme nach biochemischer Differenzierung.

Species	insgesamt angezüchtete Stämme	nicht erfaßte Stämme durch	
		Serum-Tellurit- Agar	Mehnert'sche Substrate
<i>C. albicans</i>	36	8	6
<i>C. tropicalis</i>	10	3	1
<i>C. pseudotrop.</i>	6	1	-
<i>C. Krusei</i>	1	-	-
<i>C. curvata</i>	1	-	1
<i>C. pulcherrima</i>	1	-	-
andere <i>C. spec.</i>	4	4	3
insgesamt	59	16	11

Bei allen 59 angezüchteten Stämmen wurde die Chlamydo-sporenbildung unter Kartoffel-Karotten-Agar geprüft. Chlamydosporen zeigten 39 Stämme, von denen 2 in der biochemischen Reihe als *C. tropicalis* diagnostiziert wurden; das mikroskopische Bild ließ jedoch auf eine Mischkultur schließen, 1 Stamm stellte sich als *C. re-kaufii* heraus. Die übrigen 36 Stämme wurden auch in der Bunten Reihe als *C. albicans* bestimmt.

D. Diskussion

Unter den Methoden, die auf Grund morphologischer Kriterien *C. albicans* zu diagnostizieren gestatten, können wir zwei Gruppen unterscheiden. Die eine erlaubt die Identifizierung durch Vergleich des Wachstums der Candidaarten (1 - 5), die andere stützt sich auf die Chlamydosporenbildung (6 - 13). Nach SHAPIRO (1) bildet *C. albicans* auf LITTMAN's Oxygall-Agar nach 2 Tagen bei 25°C charakteristische Kolonien. MEHNERT (2) hat 2 flüssige Nährmedien (salzsaures bzw. milchsaures Kartoffelsubstrat) entwickelt, womit sie *C. albicans* und *C. tropicalis* von anderen Hefen nach 24-48stdg. Bebrütung bei 37°C differenziert. WELD (3) und FAHLBERG (4) erzielen typisches Wachstum bei 37°C nach 24 - 48 Std. unter CO₂-Einwirkung (10 % bzw. 6 - 8 %). KAFFKA (5) diagnostiziert *C. albicans* nach 15-18stdg. Bebrütung bei 37°C, wenn ein typisches Pseudomycel vorhanden ist; die Chlamydosporenbildung, 2 - 3 Tage später, bei Zimmertemperatur, gilt als Bestätigung.

Chlamydosporen gelten als Merkmal für die Diagnostik von *C. albicans* auf Nährböden nach NICKERSON (6), BAKERSPIEGEL (7) und SEELIGER (8), wenn mindestens 2 - 3 Tage bei 25°C bebrütet wurde. Schnellere Ergebnisse versprechen TASCHDJIAN (9) und KELLY (10). Sie wenden die Deckgläsermethode an und züchten innerhalb 16 - 24 Std. bei 25°C reichlich Chlamydosporen. In 18 - 24 Std. bei 20°C erreichen PAVLATOU und MARCELOU (11) auf Kartoffel-Karotten-Schrägagar dasselbe Ergebnis. WALKER (12) und JULEY (13) empfehlen Nährböden mit Zusätzen von Tween-80, auf welchen angeblich außer *C. albicans* und *C. stellatoidea* auch *C. tropicalis* Chlamydosporen bilden sollen. Die Schnelldiagnostik verlangt ein spezifisches Merkmal, das in möglichst kurzer Zeit eine vorläufige Identifizierung erlaubt. Nach LODDER und KREGER-VAN RIJ (14) sowie LANGERON und GUERRA (15) ist die Chlamydospore unter den Candidaarten für *C. albicans* und ihre Variante *C. stellatoidea* charakteristisch. Die verschiedenen Wachstumsformen werden dagegen von mehreren Arten entwickelt und gehen außerdem ineinander über. Der Begriff

Chlamydospore wird heute nur morphologisch gebraucht und bezeichnet bei den Hefen eine Zelle mit dicker Außenmembran, die sich deutlich von den anderen Hefezellen abhebt. Über ihre Funktion wird damit nichts ausgesagt. Ihre Bedeutung bei *C. albicans* ist noch nicht bekannt (17, 18, 19). WETTSTEIN (20) erwähnt Chlamydosporen bei Mucoraceae, Ascomycetes, Basidiomycetes, Hymenomycetes, Uredinales und Ustilaginales sowie Fungi imperfecti. Bei Ustilaginales z.B. stellt die Chlamydospore das Stadium der Kopulation einkerniger Sporidien dar, bei Uredinales die Dauerform der Sporidien. LANGERON und GUERRA (15) beschreiben sehr eingehend die Protochlamydospore als eine große, ovale oder keulenförmige Zelle, welche die Chlamydospore mit dem Pseudomycel verbindet. RIETH (21) meint, daß diese wegen der Tanzkörperchen besonders stoffwechselaktiv sei. Da einzelne Chlamydosporen auf Sabouraud-Maltose-Agar weder sproßten, noch sich sonst veränderten, wenn sie nicht mit der Protochlamydospore verbunden waren, dürften Protochlamydospore und Chlamydospore als Entwicklungseinheit anzusehen sein, die für die Regeneration der Hefezellen verantwortlich ist. Auf Reisagar nach TASCHDJIAN (9) kann man sehr gut beobachten, wie aus einer Hefezelle ein kurzes Pseudomycel von 2 - 3 Zellen entsteht. Sobald sich die letzte Sproßzelle zur Protochlamydospore verdickt und gleichzeitig eine Chlamydospore bildet, setzt eine Ruhepause im Wachstum ein. Während dieser Zeit entwickeln die Zellen vor der Protochlamydospore weiterhin Pseudomycel, bis schließlich auch die Protochlamydospore zu neuer Zellsprossung ansetzt. Bei der vielfältigen Zusammensetzung der Nährböden fällt es schwer, irgendwelche Substanzen für die Bildung von Pseudomycel und Chlamydosporen verantwortlich zu machen. Im allgemeinen wird ein an Nährstoffen armes Milieu gefordert, jedoch gelang es, auf dem besonders nährstoffreichen Sabouraud-Maltose-Agar nach Bebrütung im Zeißlertopf, Chlamydosporen zu erzeugen. Somit scheinen weniger die Nährstoffe, als vielmehr die Temperatur und die Sauerstoffspannung die Chlamydosporenbildung zu beeinflussen. Dafür spricht auch, daß SEELIGER, TASCHDJIAN, KELLY sowie PAVLATOU und MARCELOU halbanaerobes Milieu (Agarstich, Deckgläschenmethode und Schrägagar mit punktförmiger

Beimpfung) benutzen, um die Chlamydosporenbildung zu fördern. Bereits KOHL (16) weist darauf hin, daß die Sproßzellen von *C. albicans* aerotrop seien und ihr Wachstum vom Grad der Sauerstoffspannung im Agar abhinge. Nach den Ergebnissen mancher Autoren (2, 3, 4, 5) und den eigenen fördert die Bebrütung bei 37°C die Pseudomycelentwicklung, bei 30°C die Zellvermehrung und bei 20 - 25°C die Chlamydosporenbildung (6, 7, 8, 9, 10, 11). Umständlich ist bei den Methoden nach SEELIGER sowie PAVLATOU und MARCELOU, daß man von den Kulturen erst Objektträgerpräparate herstellen muß, um mikroskopieren zu können. Bei den Verfahren von TASCHDJIAN und KELLY muß es als Nachteil angesehen werden, daß die ganze Petrischale mikroskopiert und sehr leicht während dieser Zeit durch Luftkeime verunreinigt wird; außerdem benötigt man, um 1 - 2 Stämme zu prüfen, eine Platte, d.h. also relativ viel Agar. Die Vorzüge der SCHIFF'schen Methode liegen darin, daß auf einfache Weise die Sauerstoffspannung erniedrigt wird, indem der überschichtete Agar die Hefezellen einschließt. Die Bebrütung bei 2 verschiedenen Temperaturen ist deshalb sehr günstig, weil dadurch zuerst die Pseudomycelentwicklung gefördert wird, die, wie wir feststellten, die Voraussetzung für die Chlamydosporenbildung darstellt; schließlich ist das Verfahren wirtschaftlicher im Agarverbrauch. Die Schnellmethode läßt sich dadurch verbessern, daß man das Untersuchungsmaterial in Nährmedien anreichert, um rascher zu Reinkulturen zu gelangen. Nach unseren Versuchsergebnissen eignen sich für die Anreicherung die klare Malzbrühe nach VITÉZ (22), zur Isolierung von Reinkulturen der Sabouraud-Maltose-Agar.

Da sich die Differentialnährböden zur Anzüchtung nicht als optimal erwiesen, halten wir für die Kultivierung von Sproßpilzen Malzbrühe und Sabouraud-Maltose-Agar am geeignetsten. Für eine Schnelldiagnostik von *C. albicans* ist aber der Kartoffel-Karotten-Agar im Verfahren nach SCHIFF vorzuziehen.

E. Zusammenfassung

=====

An 50 aus Untersuchungsmaterial isolierten Stämmen von *C. albicans* wurden verschiedene Züchtungsmethoden hinsichtlich ihrer Eignung für die Chlamydosporenbildung geprüft. Hierbei zeigte sich, daß für die Entwicklung von Chlamydosporen weniger die Nährbodenzusammensetzung als vielmehr die Bebrütungstemperatur und vor allem die Sauerstoffspannung ausschlaggebend sind. An *C. albicans*-Kulturen durchgeführte morphologische Studien ließen 3 aufeinanderfolgende Entwicklungsphasen erkennen: Zellvermehrung, Pseudomycel- und Chlamydosporenbildung. Das einfache Objektträger-Überschichtungsverfahren nach SCHIFF war unter Verwendung des Nährbodens nach PAVLATOU und MARCELOU allen anderen Methoden überlegen, weil es am schnellsten zu reichlicher Chlamydosporenbildung führt. Von 10 weiteren Species, die mit diesem Verfahren geprüft wurden, bildete lediglich *C. stellatoidea* Chlamydosporen. Bei der Untersuchung von 90 eingesandten Untersuchungsproben führte eine Anzüchtung auf Sabouraud-Maltose-Agar und in Malzbrühe nach VITEZ zu den besten Resultaten. In 59 Fällen wurden Sproßpilze isoliert, von denen 39 mit Hilfe der Objektträger-Überschichtungsmethode Chlamydosporen entwickelten. Die biochemische Prüfung ergab 36 Stämme von *C. albicans*, zwei Mischkulturen von *C. albicans* mit *C. tropicalis* und einmal *C. rekaufii*. Danach ist der Nachweis von Chlamydosporen für eine schnelle, allerdings nur vorläufige Diagnose von *C. albicans* gut geeignet.

F. L i t e r a t u r

- =====
1. SHAPIRO, E.M., MULLINS, F.J., PINKERTON, M.E.: Direct Identification of *Candida albicans* on Littman's Osgall-Agar.
J.Invest.Dermat. 26, 77-88 (1956).
 2. MEHNERT, B.: Nachweis und Differenzierung pathogener Hefen im Untersuchungsmaterial von Mensch und Tier.
Zbl.Bakt. I Orig. 184, 240-246 (1962).
 3. WELD, J.T.: *Candida albicans*. Rapid Identification in Pure Cultures with Carbon Dioxide on Modified Eosin-Methylene-Blue Medium.
Arch.Derm.Syph. 66, 691-694 (1952).
 4. FAHLBERG, W.J., DUKES, C.D., GUTHRIE, R.K.: Rapid Classification of *Candida albicans*.
J.Invest.Dermat. 29, 111-118 (1957).
 5. KAFFKA, A.: Tellurithaltige Serum-Nährmedien zur Differenzierung von *Candida albicans*.
Zbl.Bakt. I Orig. 165, 264-274 (1956).
 6. NICKERSON, W.J., MANKOWSKY, Z.: A Polysaccharide Medium of Known Composition Favoring Chlamydospore Formation.
J.Infect.Dis. 92, 20-25 (1953).
 7. BAKERSPIEGEL, A.: Soil Extract Agar for *Candida albicans*.
Arch.Derm.Syph. 69, 735 (1954).
 8. SEELIGER, H.P.R.: Ein neues Medium zur Pseudomycelbildung von *Candida albicans*.
Zschr.Hyg. 141, 488-494 (1955).

9. TASCHDJIAN, C.L.: A Simple Prepared Identification Medium for *Candida albicans*.
Mycologia 45, 474-475 (1953).
Routine Identification of *Candida albicans*.
Mycologia 49, 332-338 (1957).
10. KELLY, J.P., FUNIGIELLO, F.: A Study of Media Designed to Promote Chlamydospore Production.
J.Lab.&Clin.Med. 53, 807-809 (1959).
11. PAVLATOU, M., MARCELOU, U.: Milieu favorisant la formation des chlamydospores de *Candida albicans*.
Ann.Inst.Pasteur 91, 410-413 (1956).
12. WALKER, L., HUPPERT, M.: Corn-Meal-Tween Agar: An Improved Medium for the Identification of *Candida albicans*.
Am.J.Clin.Path. 33, 190-196 (1960).
13. JULEY, L., WALCH, H.Jr., BIRD, E.: Enriched Proline-Tween-Agar: A Medium for Identification of *Candida*.
Am.J.Clin.Path. 37, 664-666 (1962).
14. LODDER, J., KREGER-VAN RIJ, N.J.W.: The Yeasts, A Taxonomic Study.
North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1952.
15. LANGERON, M., GUERRA, P.: Nouvelles Recherches de Zymologie Médicale.
Ann.Parasit.hum. XVI, 36-84, 162-179, 429-476 (1938).
16. KOHL, F.G.: Die Hefepilze.
Quelle & Meyer, Leipzig 1908, 309-311.
17. REIFF, F., KAUTZMANN, R., LÜERS, H., LINDEMANN, M.:
Die Hefen, Bd. I: Die Hefen in der Wissenschaft.
W. Schmidt, Nürnberg, 1960.
18. AINSWORTH, G.C.: The Fungi, Vol. I: The Fungal Cell.
Academic Press, New York, London, 1965, 26.

19. GESSNER, F., VON BERTALANFFY, L.: Handbuch der Biologie,
Bd. III,1; 245 (1955-63).
20. WETTSTEIN, R.: Handbuch der systematischen Botanik.
Asher & Co., Amsterdam 1962, 209-274.
21. RIETH, H., SCHÖNFELD, I.: Zur Diagnostik und Therapie
der Mykosen durch imperfekte Hefen (Cryptococaceen).
Arch.klin.u.exp.Dermat. 208, 343-361 (1959).
22. VITĚZ, I.: Nährböden zur Züchtung und Identifizierung
von pathogenen Pilzen.
Zbl.Bakt. I Orig. 178, 523-530 (1959).

Herrn Professor Dr. med. R. Siegert danke ich für die Themenstellung, die Überlassung eines Arbeitsplatzes und die Förderung meiner Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. H.-L. Müller für die mir jederzeit gewährte Hilfe und Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 12. Febr. 1940 wurde ich als zweite von vier Töchtern des Elektro-Ing. Walter Koeppel und seiner Ehefrau Ilse, geb. Klatt, in Berlin-Spandau geboren. Ab Herbst 1940 bis zur Vertreibung 1945 lebte die Familie in Oberschreiberhau/Riesengebirge. Nach kurzem Aufenthalt in Asch/Sudetenland, wo mein Vater noch zum Kriegsdienst eingezogen wurde und zwischen 16./18. April 1945 bei Großkötz/Niederlausitz fiel, wohnen wir seit 24. Juni 1945 in Erlangen.

Von Herbst 1946 - 1950 besuchte ich hier die Volksschule, anschließend zwei Jahre das humanistische Gymnasium Friedericianum und dann bis zum Abitur im Sommer 1959 das Deutsche Gymnasium. Nach einem Semester Studium der Geschichte und Anglistik an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen wechselte ich über zur Zahnmedizin. Bis zum Physikum im Sommer 1962 studierte ich ebenfalls in Erlangen, danach bis zum Staatsexamen an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn. Dort erhielt ich im Sommer 1965 die Approbation.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

in Erlangen: Bauer, Fießelmann, Fleischmann, Keidel,
May, Meuwsen, Paschke, Schwemmlé und
Stammer;

in Marburg/L.: Berendes, Braun-Falco, Dölle, Gedigk,
Hering, Heuser, Janke, Korb, Löhr,
Maurath, Pantke, Rodeck, Schiff, Schmid
und Siegert.

